

尼群地平对猪冠状动脉舒缩活动和 主动脉平滑肌细胞增殖的影响

涂玉林 杨小毅 万载阳 周元芳

(衡阳医学院心血管病研究所, 衡阳 421001)

Effects of Nitrendipine on Activity of Coronary Artery and Proliferation of Aortic Smooth Muscle Cell in Porcine

TU Yu-Lin, YANG Xiao-Yi, WAN Zai-Yang and
ZHOU Yuan-Fang

(Institute of Cardiovascular Disease, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT

Aim This study was searched for active mechanism of nitrendipine that prevents and treats atherosclerosis.

Method The experiments were performed in coronary arterial rings of porcine.

Results Nitrendipine inhibited proliferation of cultured vascular smooth muscle cell with MTT colorimetric assay in porcine.

Conclusions Nitrendipine may play an important role on antiatherosclerosis.

KEY WORDS Nitrendipine; Coronary artery; Vascular smooth muscle cell

摘要 采用离体血管实验观察到尼群地平能使冠状血管松弛,这种松弛作用与血管内皮完整与否无关。同时,我们还观察到,尼群地平可抑制培养的动脉平滑肌细胞的增殖。提示尼群地平舒张血管和抑制血管平滑肌增殖,可能是其抗实验性动脉粥样硬化作用的重要机制之一。

关键词 尼群地平; 冠状动脉; 血管平滑肌细胞

在整体实验中,我们发现尼群地平具有抗食饵性动脉粥样硬化作用^[1],并且这种作用与

抑制高脂血症诱导的血小板聚集性增加和抑制 Ca^{2+} 进入动脉壁有关^[1~3]。血小板活性和 Ca^{2+} 都与血管平滑肌细胞增殖有关,血管内皮细胞损伤和血管平滑肌细胞增殖在动脉粥样硬化的发生发展过程中起着十分重要的作用。为进一步探索尼群地平抗动脉粥样硬化的机制,本研究观察了尼群地平对离体冠状动脉舒缩功能以及培养的血管平滑肌细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

尼群地平原料药由湖南洞庭制药厂提供(Nitrendipine, 910108),噻唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT, Fluke]和 5-羟色胺(Serotonin, 5-HT)为瑞士进口分装,其余均为国产分析纯试剂。

1.2 离体血管试验

屠宰场新鲜宰杀的健康成年猪,取出心脏,立即置于冰冷的 Krebs-Ringer 液中。仔细分离冠状动脉左旋支,制备成 3.5~4.0 mm 血管环,置于 37℃ Krebs-Ringer 液(组成成分见表 1, Table 1)浴槽中,通入 95% O_2 + 5% CO_2 ,借助张力传感器,用二道生理记录仪(LMS-2B 型,成都仪器厂)记录血管环张力。给药前,血管环在静息张力 2.0 g 作用下平衡 2 h,采用 5-HT (1.0 $\mu\text{mol/L}$)使血管环收缩,待其收缩达到稳定状态后开始试验。依次向浴槽内加入不同浓度的尼群地平,记录血管环张力的变化。

Table 1. Components of Krebs-Ringer (mmol/L).

NaCl	118.0	KCl	4.8	CaCl_2	2.5
MgSO_4	1.2	KH_2PO_4	1.2	NaHCO_3	24.0
Glucose	11.0				

部分血管环去除内皮,采用缓激肽方法测定并确认其去内皮效果后,重复上述试验。

1.3 血管平滑肌细胞增殖的抑制试验

自屠宰现场取新鲜猪主动脉,经 Hank 氏液洗涤后纵向剪开,去内膜并剥离外膜,将留下的中膜剪成 0.2 mm~0.3 mm 小块,种植于培养瓶内^[4],用含 10% 小牛血清的 M199 培养液培养,待细胞长满后,以 0.125% 胰蛋白酶及 0.02% EDTA 混合液消化处理后传代。本实验采用第 5~10 代细胞。

根据 Mosmann 方法^[5],将 5×10^7 细胞/L 接种于 96 孔培养板上,每孔 100 μ l, 37℃ 培养过夜。用无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 Hank 液洗三遍,根据实验需要,采用含 10% 小牛血清的培养液分别配制不同浓度的尼群地平培养液,每孔 100 μ l,继续培养 72 h。然后加入 MTT 液 10 μ l,再培养 4 h 后,吸弃培养液。每孔加入 100 μ l 酸化异丙醇,混匀,结晶完全溶解时,其溶液呈现紫蓝色,立即用酶标仪(DG-3022 型,华东电子管厂)于 570 nm 处测定吸光值。

1.4 统计学处理

结果采用均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,其差异的显著性采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 尼群地平对血管舒缩活动的影响

采用 5-HT 使冠状血管环收缩,当其收缩处于稳定状态时,产生的张力为 4.45 g,在此条件下开始本实验。每次加入尼群地平前,都重复使用 5-HT,以尼群地平剂量(mg/L)为横座标,血管环舒缩的张力变化(g)为纵座标,将结果绘制成图。从附图(Figure)可见,随着尼群地平剂量不断加大,血管张力逐渐变小。到尼群地平剂量达 160 mg/L 时,曲线几乎接近基线,表明尼群地平具有明显的血管松弛作用。

用去除内皮的冠状血管环重复上述实验,结果没有发生变化,说明相应剂量的尼群地平的舒血管作用,对有无血管内皮存在的血管环之间存在的差异,统计学上无显著性($P > 0.05$),说明尼群地平的舒张冠状动脉作用可能与内皮的完整性无关。

2.2 尼群地平对血管平滑肌细胞增殖的作用

将血管平滑肌细胞种植于培养板上,用含

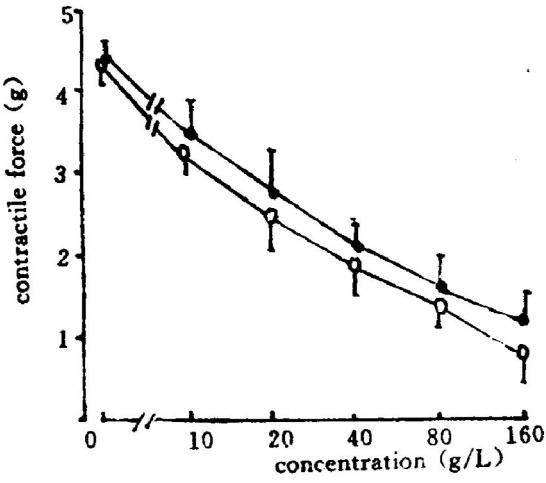


Figure. Effect of nitrendipine on porcine coronary arterial rings. ○: to retain endothelium, ●: remove endothelium.

0.5% 血清的培养液培养,将其同步化;然后用 15% 血清培养液刺激其增殖,进行增殖抑制试验。在 96 孔培养板上,将培养的细胞分为 6 组,每组 16 孔,加入不同剂量的尼群地平,继续培养后,得到的结果列于表 2 (Table 2)。可见,尼群地平能明显抑制平滑肌细胞增殖,而且随着尼群地平的剂量不断加大,平滑肌细胞增殖的抑制程度逐渐加深,两者呈负相关关系($r = 0.9481, P < 0.001$)。

Table 2. Effects of nitrendipine on proliferation of cultured aortic smooth muscle cell in porcine($\bar{x} \pm s$).

Dosage of nitrendipine(mg/L)	absorbent spectrum
0	0.358±0.012
10	0.318±0.030
20	0.301±0.024
40	0.251±0.018 ^b
80	0.205±0.021 ^b
160	0.156±0.016 ^c

b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$; compared with 0 mg/L of dose.

3 讨论

自从 1982 年 Ringer 确定 Ca^{2+} 在维持心血管功能方面的关键作用后,有关钙拮抗剂的研究与应用获得巨大进展。近年来,人们注意到钙

拮抗剂对心血管的保护及抗动脉粥样硬化作用,提出钙拮抗剂除减少细胞内钙超负荷及Ca²⁺沉着外,还促进缺血部位血流分布,保护血管内皮细胞,维护细胞选择性通透性,刺激前列环素、一氧化氮等血管活性物质的形成与释放,保护血管网的完整性。动物实验以及在人体的研究中都发现,动脉粥样硬化与内皮损伤密切相关^[6,7],我们在获得尼群地平抗动脉粥样硬化的在体动物实验资料^[1~3]后,开始进行离体器官研究。离体猪冠状动脉实验表明,不管内皮去除与否,尼群地平对冠状动脉均呈舒张效应。这一结果提示,即便在发生动脉粥样硬化后,已有内皮损害的冠状血管,使用尼群地平仍然可以解除冠状动脉痉挛。

动脉粥样硬化病变的特征性变化是斑块内出现泡沫细胞。多数研究者认为,斑块内泡沫细胞的主要来源是血管中膜的平滑肌细胞。在某些因素刺激下,血管中膜平滑肌细胞移行、并迁入内皮下,增殖成为斑块中的主要细胞成份,继而吞噬脂质而形成泡沫细胞。因此,Ross 等人认为,平滑肌细胞的增殖是动脉粥样硬化发生发展的关键环节。本实验结果显示,尼群地平具有剂量依赖性抑制血管平滑肌细胞增殖作用,

结果过去的工作,上述结果表明,尼群地平具有预防和治疗动脉粥样硬化与冠心病的作用。

参考文献

1 涂玉林,杨小毅,黄红林,等. 尼群地平对食饵性兔动脉粥样硬化的影响 I. 对血浆胆固醇和主动脉病变的作用. 中国动脉硬化杂志, 1994, 2(4): 153~155.
2 涂玉林,杨小毅,刘德平,等. 尼群地平对食饵性兔动脉粥样硬化的影响 II. 血小板聚集性和血浆脂质过氧化的变化. 中国动脉硬化杂志, 1995, 3(4): 312~314.
3 王北冰,涂玉林,杨小毅,等. 尼群地平对食饵性兔动脉粥样硬化的影响 III. 对血清、主动脉壁和心肌钙含量的影响. 衡阳医学院学报, 1995, 23(1): 13~15.
4 Ross R. The smooth muscle cell I. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. J Cell Biol, 1971, 50: 172.
5 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Method, 1983, 65: 55.
6 Forstermann V. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. Circ Res, 1988, 62: 185.
7 Minor RL. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxide from rabbit aorta. J Clin Invest, 1990, 86: 2 109.

(1996-12-20 收到, 1997-02-26 修回)

《中国动脉硬化杂志》第一届编辑委员会

名誉主任 蔡海江
主 任 杨永宗
副 主 任 唐朝枢 邓仲端
编辑委员

韦立新*	王宗立*	王孝铭	邓仲端*	邓漪平	卢 兴
刘秉文	刘德文*	朱晓东	吕俊升	陈 琪*	陈 媛
陈文恺	陈保生	陈铁镇	沈卫峰	李元建	吴可贵
吴其夏	吴葆杰	吴满平*	杨小毅*	杨永宗*	杨和平*
林曙光*	周 群	范乐明*	胡必利*	胡维诚	赵水平
徐也鲁	涂玉林	唐朝枢*	夏辉明	黄士通	黄永麟
温进坤	楼定安*	蔡海江*			

注:姓名右上角打“*”者为常务编辑委员。